



F10001029068



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 102906 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.03.1999

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 12M 1/00, C 12Q 1/68
B 03C 1/00, 1/26, B 01L 3/02
// G 01N 33/543, C 12N 11/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

980399

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

23.02.1998

(24) Alkupäivä - Löpdag

23.02.1998

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

15.03.1999

(73) Haltija - Innehavare

1. Bio-Nobile Oy, PL 36, 20521 Turku, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Korpela, Matti, Maijamäentie 13, 21100 Naantali, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Turun Patenttitoimisto Oy, PL 99, 20521 Turku

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä ja väline aineen siirtämiseksi
Förfarande och medel för transport av ett ämne

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 687505 (B 03C 1/28), JP A 4052202 (engl. tiivistelmä), US A 4649116 (C 12M 1/00),
US A 3985649 (B 01D 35/06), WO A 94/18565 (G 01N 33/543), WO A 90/15666 (B 03C 1/00),
WO A 96/12960 (G 01N 33/543), WO A 87/05536 (B 03C 1/00), WO A 86/06493 (G 01N 33/553),
WO A 92/04961 (B 01D 35/06), WO A 95/00247 (B 03C 1/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä mikropartikkeleihin immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi ensimmäisestä astiasta toiseen astiaan. Mikropartikkelit ovat magneettista tai magnetisoitavissa olevaa materiaalia, tai mikropartikkelit on liitetty magneettiseen tai magnetisoitavissa olevaan kappaleeseen. Mikropartikkelit, joihin entsyymi tai nukleotidisekvenssi tai vastaava on immobilisoitu, vangitaan ensimmäiseen astiaan upotetun magneetin avulla, siirretään magneetti vangittuine mikropartikkeleineen toiseen astiaan, ja vapautetaan mikropartikkelit magneetin vaikutuksesta. Magneetin pinta erotetaan mikropartikkeleista ohuen venyvän kalvon avulla.

Uppfinningen gäller en metod för att från ett kärl till ett annat kärl förflytta ett enzym, speciellt ett enzym som skall användas i molekylbiologin, eller en nukleotidsekvens, varvid enzymet eller nukleotidsekvensen immobiliserats vid mikropartiklar. Mikropartiklarna består av ett material, som är magnetiskt eller som kan magnetiseras, eller mikropartiklarna har fästats vid ett stycke, som är magnetiskt eller som kan magnetiseras. Mikropartiklarna, vid vilka enzymet eller nukleotidsekvensen eller motsvarande immobiliserats, infångas med hjälp av en i det första kärlet nedsänkt magnet, magneten med de infångade mikropartiklarna förflyttas till det andra kärlet, och mikropartiklarna befrias från magnetfältets verkan. Magnetens yta åtskiljs från mikropartiklarna med hjälp av en tunn tänjbar membran.

Keksinnön kohteena on menetelmä immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi, menetelmään pohjautuva entsyymin tai nukleotidisekvenssin annostelujärjestelmä sekä menetelmässä käytettävä siirtolaite. Keksintö koskee myös menetelmän soveltamista molekyylibiologian alalla.

TEKNIIKAN TASO

Molekyylibiologiassa suoritettavissa menetelmissä, joissa manipuloidaan DNA:ta tai RNA:ta käytetään hyväksi restriktioentsyymejä ja DNA/RNA modifioivia entsyymejä. Näiden entsyymien käytöllä on keskeinen merkitys lähes kaikessa molekyylibiologian alueella tapahtuvassa työskentelyssä. Molekyylibiologian laboratorioissa yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat restriktioentsyymit. Nämä entsyymit ovat mahdollistaneet alueella tapahtuneen valtaisan kehityksen. Restriktioentsyymit tunnistavat erittäin tarkasti DNA:n nukleinihapposekvenssin, jonka ne pilkkovat. Tunnistusalue on erityinen emäsjärjestys DNA:ssa, jonka restriktioentsyymi tunnistaa. Nämä emäsjärjestykset ovat yleensä 4-8 emästä pitkiä. Katkaisupaikka on tarkka kohta DNA:ssa ja yleensä tunnistuskohdan sisällä. Esimerkiksi restriktioentsyymi EcoRI tunnistaa spesifisesti DNA:ssa olevan emäsjärjestyksen:

...5' -G A A T T C-3' ...

...3' -C T T A A G-5' ...

Restriktioentsyymi EcoRI katkaisee lisäksi tarkasta kohdasta tunnistusalueen sisältä DNA ketjussa olevan guaniinin(G) ja adeniinin (A) välillä olevan sidoksen:

...5' -G-3' 5' -A A T T C-3' ...

...3' -C T T A A-5' 3' -G-5' ...

Tarkat restriktioentsyymien DNA-ketjun tunnistusominaisuu-

det ja katkaisukohdat ovat ne tärkeät ominaisuudet, jotka ovat tehneet restriktioentsyymeistä niin hyödyllisen ja tarpeellisen työkalun molekyylibiologeille. Restriktioentsyymejä tunnetaan jo noin 1000 erilaista ja kaupallisesti-kin on saatavilla yli 200 erilaista.

Restriktioentsyymien käyttäminen molekyylibiologian sovel-
luksissa on lähinnä rutiinityöskentelyä ja useissa tapauk-
sissa näiden entsyymien käyttämiseen liittyy työläitä
välivaiheita. Hyvä esimerkki on tarvittavat toimenpiteet
restriktioentsyymien aktiivisuuden poistamiseksi niiden
käytön jälkeen. Monille restriktioentsyymeistä tarvitaan
fenoliuutos niiden inaktivoimiseksi käytön jälkeen. Fenoli-
uutokset ovat erittäin työläitä ja tekijän kannalta hyvin
epämiellyttäviä toimenpiteitä. Lisäksi näissä uutoksissa
syntyy runsaasti ongelmajätettä. Useille restriktioentsyy-
meille kaupalliset valmistajat ehdottavat kuumakäsittelyä
entsyymien inaktivoimiseksi, mutta käytännössä käyttäjät
usein suorittavat fenoliuutoksen varmistukseksi entsyymien
inaktivoitumisen. Kuumennuskäsittelyn jälkeen entsyymien
aktiivisuudesta saattaa olla vielä jäljellä useita prosent-
teja. Koska restriktioentsyymejä ei ole voitu poistaa
nykyään tunnetuilla tekniikoilla, on ongelma ratkaistu
entsyymien inaktivoimisella, esimerkiksi kuumakäsittelyllä
tai fenoliuutoksella. Toinen epäkohta on se, että käytet-
tyä, kallista entsyymiä ei voida käyttää uudelleen. Vähem-
män aikaa vieviä, mutta muuten ongelmallisia ovat erilaiset
spin-kolonnit DNA:n puhdistamiseksi reaktioluoksesta.
Näiden kolonnien käyttö on erittäin kallista eivätkä ne
toimi läheskään kaikkien entsyymien poistamiseksi DNA:n
joukosta. Tässäkään tapauksessa poistettua entsyymiä ei
voida käyttää uudelleen.

Fenoliuutoksen käyttäminen monien muidenkin molekyylibiolo-
gian alueella yleisesti käytettävien nk. DNA/RNA modifioi-
vien entsyymien inaktivoimiseksi on tarpeellista. Esimerk-
keinä voidaan mainita CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phos-
phatase) ja Proteinaasi K.

Restriktioentsyymien kanssa työskenneltäessä täytyy huolehtia myös monista muista käyttöä rajoittavista tekijöistä. Eräs keskeinen restriktioentsyymien ominaisuus on nk. star-aktiivisuus, jolla tarkoitetaan restriktioentsyymin ominaisuutta pilkkoa DNA:ta epätarkasti eli ei-halutuista kohdistista. Yksi tähän restriktioentsyymien ominaisuuteen vaikuttava tekijä on glyserolin määrä reaktioseoksessa. Kaupalliset restriktioentsyymit toimitetaan yleensä liuoksena, joka sisältää 50 % glyserolia. Glyserolin käyttötarkoitus on estää entsyymiliuosta jäätymästä -20 °C pakkassäilytyksessä. Normaalikäytössä restriktioentsyymejä lisätään reaktioon hyvin pieniä määriä, jopa alle 1 µl:n määriä. Jos glyserolipitoisuus reaktioseoksessa nousee liian korkeaksi, aiheuttaa se monissa tapauksissa suuren ongelman juuri edellä mainitun star-aktiivisuuden esiintymisenä. Tämä rajoittaa useita molekyylibiologisia aplikaatioita restriktioentsyymien käytön suhteen. Toinen merkityksellinen seikka on se, että reaktioseoksen kokonaistilavuus tulee pyrkiä pitämään mahdollisimman pienenä, jotta entsyymiaktiivisuus olisi kyllin nopea. Nämä kaksi edellä mainittua asiaa vaikuttavat suoraan siihen, että tämänhetkisillä kaupallisilla restriktioentsyymivalmisteilla ei voida suorittaa kovinkaan joustavasti suurta restriktioentsyymipitoisuutta vaativia reaktioita. Kaupallisesti saatavat restriktioentsyymit toimitetaan yleensä yhdessä tai enintään kahdessa vakioipitoisuudessa (U/ml). Haluttaessa lisätä paljon restriktioentsyymiä reaktioon kasvaa glyserolin/liuoksen osuus reaktiossa liiaksi. Tuloksena saadaan helposti star-aktiivisuutta ja reaktiokinetiikka on merkittävästi hidastunut. Glyserolin poistamiseksi ennen annostelua ei ole esitetty keinoja.

Perinteisesti restriktioentsyymeillä on laaja käyttöalue DNA:n pilkkomisessa halutuista kohdista esimerkiksi geenien kloonauksessa plasmidivektoreihin. Restriktioentsyymien käytölle löytyy jatkuvasti uusia sovelluksia. Esimerkkeinä voidaan mainita genomien kartoitusprojektit (esim. Human Genome Project), AFLP, RFLP, mutaatioiden määritykset ja

erilaiset DNA/RNA:n monistusmenetelmät (esim. Inverse PCR). Restriktioentsyymejä tarvitaan menetelmissä pilkkomaan tutkittava DNA-materiaali aluksi pienemmiksi paloiksi, joista myöhemmin voidaan määrittää esimerkiksi yksityiskohmainen emäsjärjestys (sekvenointi). RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) -tekniikassa käytetään myös hyväksi restriktioentsyymejä niiden spesifisyyden takia. RFLP -tekniikassa saadaan restriktioentsyymikäsittelyn jälkeen tutkittavasta DNA:sta ns. sormenjälki. Tätä tekniikkaa käytetään laajasti muun muassa isyystutkimuksissa, rikostutkimuksissa, epidemiologisissa tutkimuksissa ja mutaatioiden määrittämisessä. Nämä esimerkit kuvaavat restriktioentsyymien käyttöä sovelluksissa, joiden automatisoinnin tarve on suuri. Tässä keksinnössä kuvatussa menetelmän etuja on magnetoitavaan materiaaliin immobilisoitujen restriktioentsyymien huomattavasti helpompi soveltuvuus automatisoituihin määrittäksiin verrattuna ei-immobilisoi-
tuihin restriktioentsyymeihin.

Patenttikirjallisuuden mukaan on myös ehdotettu valmisteita, joissa restriktio- ja vastaavia molekyylibiologiassa käytettäviä entsyymejä on immobilisoitu kiinteään kantajaan. Kansainvälisessä patenttijulkaisussa WO 92/15674 on ehdotettu sekä restriktioentsyymien että DNA/RNA modifioivien entsyymien immobilisointia kalvoon, joka koostuu polymeerista tai lasikuidusta. US 4,342,833 kuvaa myös immobilisoituja restriktioentsyymejä, joissa kiinteänä kantajana käytetään CNBr aktivoitua agarosia. Yleisesti magneettipartikkelien käyttöä entsyymien immobilisoinnissa on kuvattu patenttijulkaisussa US 4,698,302, joskin tässä patenttijulkaisussa ei ollut mainintaa molekyylibiologian alueella käytettävistä entsyymeistä. Magneettipartikkelien erottaminen mainitussa patenttijulkaisussa tehtiin perinteisesti ulkopuolisen magneetin avulla.

Perinteinen magnetoitavan materiaalin sitominen reaktioastian sisäseinämään reaktioastian ulkopuolisen magneetin luoman magneettikentän vaikutuksesta ei sovellu hyvin

pienien (10-200 µl) liuostilavuuksien käsittelyyn. Patenttikirjallisuudessa on esitetty useita erilaisia magnetoitavan materiaalin erotusvälineitä. Kansainvälisessä patenttijulkaisussa WO 87/05536 on esitetty erotusväline, jossa muovisen holkin sisällä liikkuvalla kestopagneetilla voidaan magnetoitavaa materiaalia siirtää astiasta toiseen. Suomalaisissa patenttijulkaisuissa (FI 8605002, FI 9503669, FI 9701665, FI 9701666, FI 9701667 ja FI 9701668) on kuvattu samaten erilaisia kestopagneetin käyttöön perustuvia menetelmiä siirtää magnetoitavaa materiaalia astiasta toiseen. Patenttijulkaisuissa US 4272510, US 4649116 ja US 4751053 on kuvattu sähkömagneetin käyttöön perustuvia magneettisen materiaalin siirtoja lähinnä RIA ja EIA-määrityksissä. Missään edellä mainituista julkaisuista ei kuvata menetelmää molekyylibiologisissa menetelmissä ongelmallisten asioiden ratkaisemiseksi. Mainituissa patenttijulkaisuissa ei myöskään mainita immobilisoitujen restriktioentsyymien tai DNA/RNA:ta modifioivien entsyymien käytöstä.

Magnetoitavat partikkelit kehitettiin 1970-luvun alussa erityisesti entsyymien immobilisointiin. Tämä teknologia tuli hyvin suosituksi muun muassa immunomäärityksissä. Magnetoitavien partikkelien käyttämisellä immunomäärityksissä sitoutuneen antigeeni-vasta-aine kompleksin erottamiseksi vapaasta fraktiosta tarjosi merkittävän edun sekä reaktionopeudessa että erotuksen käytännöllisyydessä. Pääasiallinen kehitys magnetoitavien partikkelien hyväksikäytössä on viimeisten vuosien aikana tapahtunut solubiologian ja immunokemian alueilla.

Reaktioliuoksessa olevat magneettipartikkelit, joihin biologinen aine, esimerkiksi solut tai vasta-aine on sidottu, on reaktion jälkeen astian ulkopuolisen magneetin avulla vangittu tiettyyn kohtaan, jolloin liuos on mahdollista poistaa ilman että magneettiset partikkelit seuraavat mukana. On myös yritetty immobilisoida molekyylibiologiassa käytettäviä entsyymejä magneettipartikkeleihin.

Yllä kuvattua teknologiaa ei ole kuitenkaan pystytty soveltamaan molekyylibiologian alalla. Partikkeleiden vangitseminen on hyvin ongelmallista pienten nestetilavuuksien takia. Solubiologian ja immunokemian alalta tunnettu tekniikka ei sovellu molekyylibiologian alalle, koska tällä alalla käytettävät nestemäärät ovat erittäin pieniä, eli suuruusluokkaa 10 - 100 μ l, kun vastaavat määrät immunokemian alalla ovat usein millilitran suuruusluokkaa ja solubiologian alalla tyypillisesti 10 - 100 ml.

KEKSINNÖN TARKOITUS

Tämä keksintö tähtää muun muassa molekyylibiologian menetelmissä ja sovelluksissa käytettävien entsyymien helppokäyttöisyyden lisäämiseen ja kalliiden entsyymien uudelleenkäyttöön.

Tämän keksinnön tarkoituksena on poistaa edellä tunnetun tekniikan ongelmat ja aikaansaada uusi menetelmä ja siihen käytettävät siirtovälineet ja järjestelmät mikropartikkeleihin immobilisoitujen, molekyylibiologiassa käytettävien entsyymien tai nukleotidisekvenssien siirtämiseksi reaktioastiaan ja sieltä pois.

Tarkoituksena on erityisesti aikaansaada menetelmä, jolla mikropartikkeleihin immobilisoitu restriktio- tai muu molekyylibiologian alueella käytettävä entsyymi voidaan siirtää entsyymien annosteluastiasta reaktioastiaan, ja poistaa reaktiossa käytetty entsyymi ja ottaa se talteen reaktioastiasta.

Tarkoituksena on myös aikaansaada menetelmä, jolla immobilisoitu entsyymi voidaan pesulla vapauttaa glyserolistä tai vastaavasta reaktiota häyttävästä aineesta ennen kuin se viedään reaktioastiaan.

Tarkoituksena on myös aikaansaada mikropartikkeleihin immobilisoidun entsyymien annostelu-, pesu- ja talteenotto-

järjestelmä, jonka avulla ennalta määritetyn entsyymimäärän annostelu reaktioastiaan ja talteenottaminen sieltä on helposti automatisoitavissa.

Tarkoituksena on myös aikaansaada siirtoväline, jonka avulla mikropartikkelit, joihin entsyymi tai nukleotidisekvenssi on sidottu, on helposti vangittavissa ja vapautettavissa uudelleen.

Tarkoituksena on lisäksi aikaansaada tehokkaimpia DNA:n pilkkomisreaktioita ja muita molekyylibiologisia reaktioita yllä mainitun menetelmän avulla.

KEKSINNÖN KUVAUS JA SUOSITELTAVAT SUORITUSMUODOT

Keksinnön tunnusmerkit ilmenevät patenttivaatimuksista.

Keksinnön kohteena on siten menetelmä mikropartikkeleihin immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi ensimmäisestä astiasta toiseen astiaan. Keksinnölle on tunnusomaista, että mikropartikkelit ovat magneettista tai magnetisoitavissa olevaa materiaalia, tai mikropartikkelit on liitetty magneettiseen tai magnetisoitavissa olevaan kappaleeseen ja että mikropartikkelit, joihin entsyymi tai nukleotidisekvenssi on immobilisoitu, vangitaan ensimmäiseen astiaan upotetun magneetin avulla, siirretään magneetti vangittuine mikropartikkeleineen toiseen astiaan, ja vapautetaan mikropartikkelit magneetin vaikutuksesta.

Keksinnön mukainen menetelmä ei rajoitu molekyylibiologian alaan, vaan se on yleisesti sovellettavissa aloilla, joilla käsitellään pieniä tilavuuksia.

Entsyymi on sopivasti restriktioentsyymi, modifioiva entsyymi tai jokin muu molekyylibiologiassa käytettävä entsyymi. Esimerkkeinä DNA/RNA modifioivista entsyymeistä voidaan mainita: Proteinaasi K, CIAP (Calf Intestinal Alkaline

Phosphatase), E. Coli alkaline phosphatase, eksonukleaasit (esimerkiksi P1 nukleaasi, S1 nukleaasi), ribonukleaasit, RNAasit (esim. Pacreatic RNAasi, RNAasi H, RNAasi T1, RNAasi M, RNAasi T2), DNA ligaasit, RNA ligaasit, DNA polymeraasit, Klenow entsyymi, RNA polymeraasit, DNA kinaasit, RNA kinaasit, terminal transferaasit, AMV reverse transcriptase ja fosfodiesterasaasit. Näiden ja muiden DNA/RNA modifioivien entsyymien käyttö on erittäin monimuotoista sekä molekyylibiologian tutkimuksessa että sovelluksissa.

Nukleotidisekvenssi voi olla mikä tahansa yksi- tai kaksiaikeinen nukleotidisekvenssi, ja on erityisesti DNA, RNA, mRNA tai cDNA.

Entsyymien tai nukleotidin immobilisointi mikropartikkeleihin tarkoittaa sitä, että entsyymi tai nukleotidisekvenssi on kiinnitetty partikkeleiden pintaan tai että se on vangittu "häkkimäisen" partikkelin sisään, kuitenkin niin, että ympäröivä liuos pääsee kosketukseen sen kanssa.

Käsite "mikropartikkeli" tarkoittaa tässä yhteydessä hyvin pieniä partikkeleita, joiden koko suositeltavasti on alueella 0.1-10 μm . Mikropartikkeli, johon entsyymi tai nukleotidisekvenssi on immobilisoitu, voi olla magneettista tai magnetoitavissa olevaa materiaalia. Toisen vaihtoehdon mukaan itse mikropartikkeli, johon aine on immobilisoitu, voi olla ei-magneettinen. Tässä tapauksessa mikropartikkeli on kiinteästi liitetty toiseen kappaleeseen, joka on magneettista tai magnetoitavissa olevaa materiaalia.

Entsyymien tai nukleotidin kiinnittäminen mikropartikkeleihin voidaan tehdä kovalenttisen sidoksen avulla, esimerkiksi kantajassa olevien amino- tai hydroksiryhmien avulla. Vaihtoehtoisesti sitominen voidaan aikaansaada bioaffiniteettiparin, esimerkiksi biotiini/streptavidiini -parin avulla. Erään tavan mukaan immobilisoitava entsyymi tuotetaan rekombinantti-DNA-teknologialla esimerkiksi Esche-

richia coli bakteerissa ja entsyymiin on tehty erityinen affiniteettihäntä. Tämä affiniteettihäntä sitoutuu mikropartikkeleihin, joihin on sopivasti kiinnitetty kyseiseen affiniteettihäntään voimakkaasti sitoutuva komponentti. Affiniteettihäntä voi olla pienimolekyylinen yhdiste tai proteiini. Tällaisella järjestelyllä halutun entsyymin puhdistamisessa voitaisiin tehokkaasti käyttää hyväksi mikropartikkeleita ja samalla mikropartikkeliin sitoutunut entsyymi olisi valmiiksi immobilisoitu mikropartikkelin pinnalle käytettäväksi keksinnössä kuvatussa menetelmässä.

Entsyymin tai nukleotidisekvenssin kiinnittäminen mikropartikkeleihin voi myös olla epäspesifinen, ei-kovalenttinen, kuten adsorptio. Esimerkkinä voidaan mainita DNA:n suora kiinnittyminen lasipintaan.

Käsite "magneettinen tai magnetisoitavissa oleva materiaali" kattaa paramagneettiset ja superparamagneettiset materiaalit. Erityisen sopiva partikkelimateriaali on jokin superparamagneettinen materiaali. Superparamagneettiset partikkelit muodostavat ulkopuolisen magneettikentän vaikutuksesta itsellensä magneettikentän, joka katoaa kun ulkopuolinen magneettikenttä katoaa. Täten partikkelit pysyvät erillisinä eivätkä saostu, mikä on edullista niiden käytön kannalta. Magnetettipartikkeleita (para- ja superparamagneettisia) valmistavat monet kaupalliset yritykset (Bangs Laboratories Inc., Dynal A.S., Advance Magnetics Inc., Scipac Limited, Pael-Lorei, CPG Inc.). Valittavissa on eri kokoisia sekä eri tavoin valmiiksi aktivoituja magneetipartikkeleita. Myös monin eri tavoin modifioituja magneetipartikkeleita on saatavilla. Esimerkkeinä voi mainita karboksyyl- ja amino-modifioidut magneettipartikkelit. Yleensä magnetiitti on sidottu polymeeriseen kantajaan kuten esimerkiksi lateksi ja sellulloosa. CPG Inc. valmistaa magneettipartikkeleita, joiden materiaali on huokoinen lasi. Kaikissa edellä mainituissa magneettipartikkeleissa on pieniä (1-20 nm) magnetiittikiteitä dispersoitu polymeerin/lasin joukkoon, joka sitten on polymeroitu ja lopputu-

loksena on magnetoitava partikkeli. Bangs Laboratories Inc. valmistaa magneettipartikkeleita, joissa magnetiittia on kontrolloidusti ainoastaan partikkeliin ytimessä. Tämä on tärkeää siksi, että rautaa ei saa vapautua reaktioluokseen monissa molekyylibiologian sovelluksissa kuten esimerkiksi PCR reaktiossa. Liuokseen vapautunut rauta inhiboi reaktion kulkua PCR reaktiossa.

Magneetti, jonka avulla partikkelit vangitaan, voi olla joko kestmagneetti tai sähkömagneetti.

Erään suositeltavan suoritusmuodon mukaan keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä magneetti on kestmagneetti tai sähkömagneetti, jonka pinta on erotettu mikropartikkeleista erillisen kalvon avulla. Kun kestmagneetti upotetaan astiaan mikropartikkeleiden vangitsemiseksi (eli kun magneetti lähennetään kalvoa kohti) kerääntyvät mikropartikkelit kalvon pintaan. Magneetti ja kalvoon kertyneet mikropartikkelit viedään sen jälkeen toiseen astiaan ja siinä viedään kestmagneetti kalvosta poispäin, jolloin mikropartikkelit vapautuvat heikentyneen magneettikentän johdosta. Sähkömagneetin tapauksessa magneettipartikkeliin keräystapahtumassa luodaan magneettikenttä ja magneettipartikkeliin irrottamiseksi magneettikenttä pysäytetään.

Keksinnön kohteena on myös mikropartikkeleiden vangitsemiseksi ja vapauttamiseksi soveltuva siirtoväline. Siirtovälineelle on tunnusomaista, että se käsittää varsiosan, ja sen päässä olevan magneetin, sekä kalvon, joka erottaa magneetin mikropartikkeleista, mutta joka ei olennaisesti heikennä mikropartikkeleihin kohdistuvaa magneettikenttää.

Oleellista on se, että viettäessä siirtoväline nesteeseen tarkoituksena kerätä liuoksessa olevat magneettipartikkelit, saatetaan siihen magneettikenttä niin, että magneettipartikkelit keräytyvät luodun magneettikentän vaikutuksesta siirtovälineen läheisyyteen.

Magneettipartikkelit eivät keräydy suoraan metallisen magneetin pintaan vaan magneetin ympärillä olevan suojakalvon ympärille. Suojakalvo on edullisimmin äärimmäisen ohut suojakerros magneetin päällä/ympärillä saattaen näin mahdollisimman suuren magneettikentän voimakkuuden liuokseen. Suojakalvo voi olla erityinen (kiinteästi, pysyvästi) magneetin ympärillä oleva inertti kerros kalvon muodostavaa ainetta esimerkiksi teflonia, silaania tms. Erityisesti tämä tapaus tulee kyseeseen käytettäessä sähkömagneettia. Suojakalvo voi olla taipuisa ja mahdollisesti myös venyvä, mutta se voi vaihtoehtoisesti olla holkkityyppinen, joustamattomasta materiaalista, esimerkiksi joustamattomasta polymeeristä valmistettu kerros, joka ei ole pinnoitteen tapaan kiinteässä yhteydessä magneettiin. Suojakalvo voi olla vielä venytetty, jolloin kalvon paksuus pienenee ja magneettikenttä voimistuu mikropartikkelien keräystapahtumassa. Keksinnön mukaisella siirtovälineellä voidaan erittäin pienen kesto- tai sähkömagneetin avulla suorittaa mikropartikkelien siirtoja pienissä astioissa olevista pienistä nestetilavuuksista.

Keksinnön mukainen siirtoväline ja annostusjärjestelmä on esitetty tarkemmin seuraavissa piirustuksissa, joissa

Kuvio 1 esittää keksinnön mukaista, kestromagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä aksiaalisuuntaisena leikkauskuvantona, jossa magneetti on partikkeleita vapauttavassa asennossa,

Kuvio 2A esittää kuvion 1 siirtovälinettä magneetin ollessa partikkeleiden keräyasennossa,

Kuviot 2B ja 2C esittävät kuvioden 1 ja 2A yksityiskohtia suurennettuina,

Kuvio 3 esittää kuvion 1 siirtovälinettä sivulta,

Kuviot 4A-4C esittävät kestromagneetin käyttöön pohjautuvaa

siirtovälinettä toisen suoritusmuodon mukaan,

Kuviot 5A-5F esittävät sähkömagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä kolmannen suoritusmuodon mukaan, ja

Kuvio 6 esittää keksinnön mukaista annostelu- ja pesujärjestelmää.

Kuvioissa 1 - 3 on esitetty siirtoväline 10, joka soveltuu entsyymiä tai nukleotidisekvenssiä sitovien mikropartikkeleiden vangitsemiseen ja uudelleen vapauttamiseen. Putkimaisessa runko-osassa 11 on aksiaalisuunnassa edestakaisin liikuteltavissa oleva tanko 17, joka toimii magneetin 18 kiinnitysvartena. Magneetti 18 on tässä ratkaisussa kestopaine magneetti ja tanko 17 voi olla magneettisesti johtavaa materiaalia. Runko-osan 11 päässä on kärkikupu 20, jonka pohja 21 on kalvomaista materiaalia. Magneetin 18 pinta 22 on painettavissa kalvoa 21 vasten, jolloin mikropartikkelit 25 kiinnittyvät kalvoon 21 (kuviot 2A ja 2B). Mikropartikkelit irtoavat, kun magneettia 18 liikutetaan poispäin kalvosta 21 (kuvio 1 ja 2C).

Kuvion 1 viitenumero 12 on runko-osan 11 sisällä liikkuva, sormella käytettävä painin. Painimen 12 lukitussalpa on esitetty viitenumerolla 13. Painimeen vaikuttaa ylöspäin vaikuttava palautusjouso 14. Painin liikuttaa välitystankoa 15, johon on kiinnitetty välitysjouso 16. Välitysjousen toiseen päähän on kiinnitetty magneetin kiinnitystanko 17. Runko-osan yhteyteen on myös sovitettu vipu 19, jonka avulla siirtovälineen alapäähän painettu kärkiosa 20 on poistettavissa siirtovälineen rungosta. Kun mikropartikkelit on siirretty haluttuun astiaan, voidaan irroittaa kärkiosa 20. Välitysjousen 16 tehtävänä on joustaa, kun magneetti 18 osuu kärkiosan 20 pohjaan 21. Tällä tavalla varmistetaan välyksetön kosketus magneetin pinnan 22 ja kalvon 21 välille, jolloin saadaan mikropartikkelit mahdollisimman voimakkaan magneettivuon vaikutukseen. Lisäksi jouso 16 voi kompensoida rakenneosien väliset valmistukses-

ta ja asennoinnista johtuvat pienet mittavaihtelut.

Yllä kuvattu siirtoväline voidaan tehdä em. periaatekonstruktion mukaisesti vaihdellen osien sijaintia, geometriaa ja materiaaleja sen mukaan kuin ergonomia eri työskentelyasunnoissa ja -olosuhteissa vaatii.

Kuvioissa 4A-4C nähdään kestopagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä toisen suoritusmuodon mukaan. Tangon 17 päähän on kiinnitetty kestopagneetti 18. Tanko 17 ja siihen kiinnitetty magneetti on nuolien mukaisesti liikkuvasti järjestetty tankoa ympäröivässä putkimaisessa kiinteässä katteessa 23. Katteen päässä on aukko 24, jonka läpi magneetti 18 on työnnettävissä. Siirtovälineen kärkiosan ympärille on sovitettu kalvo 21, joka on kiinnitetty katteeseen 23 pidikkeen 26 avulla. Kuviossa 4A magneetti 18 on mikropartikkeleita vapauttavassa asennossa ja kuvioissa 4B ja 4C magneetti 18 on mikropartikkeleita vangitsevassa asennossa. Kuviossa 4B magneetti 18 sijaitsee aivan kiinteän katteen 23 päässä. Magneetti 18 on tiukassa kontaktissa suojakalvon 21 kanssa. Kuvion 4C ratkaisussa magneetti 18 on työnnetty selvästi ulos katteen 23 aukosta 24. Tässä tapauksessa suojakalvo 21, joka on venyvää materiaalia, on selvästi venynyt ja magneetti on tiukassa kontaktissa kalvon 21 kanssa. Tanko 17 ja kate 23 on valmistettu sopivasta materiaalista, esimerkiksi muovista. Katteen 23 avulla saadaan haluttaessa magneettikenttä kohdistetuksi aivan siirtovälineen kärjen päähän. Aukon 24 ansiosta magneetti saadaan siirrettyä partikkeleiden keräyksen kanalta edulliseen asentoon. Kuviossa 4C on esitetty mahdollisuus kerätä mikropartikkelit pienen kestopagneetin (esim. tilavuus $< 50 \mu\text{l}$) ja ohuen, venyvän kalvon 21 avulla. Katteen, tangon ja magneetin muodon ja kalvon avulla on myös mahdollista vaikuttaa kalvon ulkomuotoon erityisesti mikropartikkeleiden keräys- ja siirtotapahtumaa ajatellen. Haluttaessa esimerkiksi terävähkö ulkomuoto, voidaan muuttaa magneetin ja tangon koon suhde. Katteen 23 muodolla ja sijainnilla magneetin suhteen on myös saavutettavissa

monipuolisia vaihtoehtoja.

Kuviot 5A-5F esittävät sähkömagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä. Sähkömagneetin 18 kärki on merkitty numerolla 18' ja sen runko numerolla 18''. Kuviossa 5A nähdään ratkaisu, jossa sähkömagneetin kärki ja runko ovat vapaina ilman erityistä kiinteää katetta, ja kuviossa 5B nähdään ratkaisu, jossa kärki 18' ja runko 18'' on suojattu kiinteän katteen 23 avulla. Kuvio 5C esittää kuvion 5A välineen kärkiosaa ja kuvio 5D esittää tätä samaa kärkiosaa suojakalvon 21 ympäröimänä. Kuvion 5A siirtovälineen runko 18'' ja kärkiosa 18' voidaan pinnoittaa sopivalla pinnoitteella ja valita pinnoitteen hydrofobisuus tai hydrofiilisuus sopivasti sovelluksen mukaan. Kuvion 5A kärkiosa voidaan myös jälkipinnoittaa yhden tai useamman kerran. Kuvion 5C ratkaisussa, jossa kärkiosalla ei ole erillistä suojakalvoa, on kärki pestävä ennen välineen uudelleen käyttöä. Tämä on helposti hoidettavissa esimerkiksi automaattisessa laitteessa, jossa on pesuasema. Kuvion 5C kärkiosa voidaan jälkipinnoittaa monia kertoja tarpeen mukaan. Kuvion 5D ratkaisussa suojakalvo pidetään kiinnitettynä pidikkeen 26 avulla. Suojakalvon ohuudesta johtuen sähkömagneetin kentän voimakkuus on hyvä. Sopivasti muotoillen kärkiosaa 18' voidaan välinettä käyttää pienissä tilavuuksissa.

Kuvion 5B kiinteä kate 23 voidaan valmistaa eri materiaaleista, esimerkiksi ei-ferromagneettisesta materiaalista kuten muovista, ja katteen muotoa voidaan vaihdella. Kate 23 ei peitä sähkömagneetin kärkeä 18'. Tämän ratkaisun kärkiosa voi olla ilman erillistä kalvoa (kuvio 5E) tai varustettu erillisellä suojakalvolla 21 (kuvio 5F). Kuvion 5E ratkaisussa kärkiosa voidaan pinnoittaa sopivasti valitulla pinnoitteella (vrt. kuvion 5C kärkiosa). Kuvion 5E magneetikärki 18' ja kate 23 voidaan pinnoittaa toisistaan poikkeavasti. Sähkömagneetin kärki 18' voidaan myös pinnoittaa useamman kerran. Kärkiosa on pestävä ennen välineen uudelleen käyttöä ja tämä on helposti hoidettavissa esimerkiksi automaattisessa laitteessa (vrt. kuvio 5C). Kuvion 5F

ratkaisussa kärkiosa on suojakalvon 21 ympäröimänä (pidike merkitty numerolla 26). Suojakalvon ohuudesta johtuen sähkömagneetin kentän voimakkuus on hyvä. Sopivasti muotoillien kuvioiden 5E ja 5F kärkiosia voidaan välinettä käyttää pienissä tilavuuksissa. Muuttamalla katteen 23, magneettikärjen 18' ja suojakalvon 21 suhteita toisiinsa voidaan tuntuvasti vaikuttaa partikkeleiden keräysominaisuuksiin.

Kuviossa 6 on esitetty mikropartikkeleihin immobilisoidun entsyymin annostelu- ja pesujärjestelmä. Järjestelmä käsittää levyn 30, jossa on reagenssikuoppia 31, jotka sisältävät annosteltavan määrän mikropartikkeleita, joihin entsyymi on sidottu, ja mahdollisesti tarvittavat säilytysaineet. Levyssä on lisäksi pesunestekuoppia 32, jotka sisältävät sopivan pesunesteen, johon reagenssikuopasta nostettu mikropartikkelimäärä on upotettavissa pesua varten. Reagenssikuopat 31 ja pesunestekuopat 32 on sopivasti järjestetty vierekkäisiin riveihin. Annostelu on helposti automatisoitavissa tällä järjestelmällä. Partikkeleiden siirtoväline viedään ensin reagenssikuoppaan 31, josta kerätään koko siihen annosteltu mikropartikkelimäärä. Haluttaessa voidaan ottaa suurempi määrä immobilisoitua entsyymiä raktioon keräämällä haluttu määrä entsyymiä useammasta kuopasta 31. Sen jälkeen siirtoväline siihen kiinnitettyine mikropartikkeleineen viedään tarvittaessa pesunestekuoppaan 32 tai suoraan reaktioastiaan. Pesun tarkoituksena on poistaa entsyymien säilytysliuoksesta mahdollisesti mukaan tullut glyseroli tai muu reaktiossa epäsuotuisasti vaikuttava aines entsyymivalmisteesta. Pesun jälkeen mikropartikkelit viedään reaktioastiaan. Levyssä 30 voi myös olla erillisiä pesunestekuoppia 33, jotka sisältävät sopivan pesunesteen, jolla voidaan pestä reaktioastiasta siirretyt mikropartikkelit. Levyssä 30 voi lisäksi olla isompia kuoppia eli jatkosäilytysastioita 34, joihin viedään mikropartikkelit kuopissa 33 tapahtuneen pesun jälkeen.

Edellä kuvattu siirtoväline ja levy 30 voivat yhdessä

muodostaa automaattisen laitteen pääkomponentteja. Siirtovälineitä voi laitteessa olla useitakin ja ne voivat olla kytkettyjä robottiin, joka ohjaa niiden toiminnan prosessin vaatimien olosuhteiden mukaisesti.

KEKSINNÖN SOVELLUKSET

Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu DNA:n pilkkomiseen restriktioentsyymien avulla, sekä muidenkin molekyylibiologiassa menetelmissä/sovelluksissa käytettävien entsyymien käyttöön. Mikropartikkeleihin immobilisoitu entsyymi siirretään reaktioastiaan, jossa entsyymaattisen reaktion annetaan tapahtua halutun ajan. Reaktion jälkeen siirretään mikropartikkelit ja niihin sidottu entsyymi pois reaktioastiasta. Näin immobilisoidun entsyymien inaktivointia ei tarvitse suorittaa. Käytetyt immobilisoidut entsyymit siirretään pesukuoppaan, jossa mahdolliset epäpuhtaudet reaktioseoksesta pestään pois. Pestyt immobilisoidut entsyymit siirretään keräysastiaan tai muuhun erityisesti niille varattuun astiaan niiden uudelleenkäyttöä odottaen.

Restriktioentsyymikäsittelyn jälkeen voidaan reaktioastiaan siirtää esimerkiksi mikropartikkeleihin immobilisoitu CIAP-entsyymi (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) tai jokin muu valitussa sovelluksessa tarvittava immobilisoitu entsyymi. Niiden käyttämisessä sovelletaan edellä kuvattua menetelmää saavuttaen samoja etuja kuin immobilisoitujen restriktioentsyymien tapauksessa.

Koska käytetyt entsyymit voidaan siirtää pois, saadaan entsyymien inaktivoimisvaihe poistettua kokonaan. Samalla menetelmä on huomattavasti yksinkertaisempi ja nopeampi kuin perinteinen entsyymien inaktivoiminen. Kaaviossa 1 esitetystä vertailusta yksinkertaisen restriktioentsyymi-CIAP-käsittelyn tapauksessa nähdään, että uudessa menetelmässä lukuisat vaiheet ovat jääneet pois tarpeettomina.

Kaaviossa 2 on esitetty keksinnön sovellutus DNA:ta pilkkovien ja/tai modifioivien entsyymien kierrätyksessä ja käsittelyssä.

Keksinnön avulla on aikaansaatu menetelmä, jossa mikropartikkeleihin immobilisoitua proteaasia (esimerkiksi Proteinaasi K) voidaan käyttää inaktivoimaan mikä tahansa haluttu entsyymi reaktioastiasta. Proteinaasi K on erittäin yleinen ja paljon käytetty entsyymi. Valitettavasti tämä entsyymi on erittäin stabiili ja vaatii tehokkaan inaktivoinnin (fenoliuutos). Kuvatun keksinnön mukaisesti Proteinaasi K:ta voidaan käyttää ja poistaa erittäin tehokkaasti reaktioastiasta. Toinen käyttötapa immobilisoidulle Proteinaasi K:lle on sen käyttäminen minkä tahansa liuoksessa olevan entsyymiaktiivisuuden poistamiseksi. Tällaisessa käyttömuodossa immobilisoitu Proteinaasi K täydentää keksinnön etuja yleisenä entsyymien inaktivoititoimenpiteenä. Tällainen käyttötapa on erittäin hyödyllinen esimerkiksi tapauksissa, joissa inaktivoitavaa entsyymiä ei kyetä saattamaan immobilisoitavaan muotoon, inaktivoitava entsyymi on epäpuhtautena reaktiossa tai haluttaessa varmistaa ehdoton entsyymien inaktivoituminen reaktioseoksessa. Immobilisoitu Proteinaasi K täydentää keksinnön laajamittaisen käytön molekyylibiologian sovelluksissa.

Keksinnön mukaisen menetelmän avulla voidaan ottaa entsyymitalteen reaktioseoksesta uudelleenkäyttöä varten. Menetelmän avulla voidaan myös siirtää entsyymi annosteluastiasta reaktioseokseen. Haluttaessa voidaan viedä magneetin avulla vangitut mikropartikkelit pesunesteeseen glyserolin tai muun stabilointiaineen pois pesemiseksi ennen kuin mikropartikkelit viedään reaktioseokseen. Pesuastiassa mikropartikkelit voidaan tarvittaessa vapauttaa magneettikentästä, jolloin partikkelit pääsevät vapaaksi ja pesu tehostuu.

Keksinnön kohteena olevan, ohuella kalvolla suojatun magneettisen siirtovälineen avulla saavutetaan etuja myös muissakin sovelluksissa kuin immobilisoitujen entsyymien

käytössä. Sovelluksia, joissa magnetoitavaa materiaalia käytetään, ovat esimerkiksi DNA:n puhdistus, RNA:n puhdistus, mRNA:n puhdistus, sekvenointi, affiniteettipuhdistus, cDNA kirjastojen valmistaminen, DNA/RNA koettimien valmistus, DNA/RNA koettimien leimaus, DNA/RNA hybridisaatiot, PCR menetelmät, ligaasi -amplifikaatiomenetelmät ja monistetun (esimerkiksi PCR) DNA:n määrittäminen.

Keksintö soveltuu pienten tilavuuksien käsittelyyn magnetoitavan materiaalin kanssa. Saatettaessa magneetti (suoja-kuorella varustettu) liuokseen saavutetaan suuria etuja magnetoitavan materiaalin keräystapahtumaan perinteiseen verrattuna. Erityisesti on huomioitava se, että tässä tapauksessa magneettipartikkelit voidaan yksinkertaisesti siirtää liuoksesta pois. Perinteisessä tavassa magneettipartikkelit jäivät reaktioastiaan ja liuos dekantoitiin pois. Saatettaessa magneetti liuokseen on magneetin ja magneettipartikkelien etäisyys lyhyempi verrattuna ulkopuolisen magneetin käyttöön. Samaten liuospintaan jäävien magneettipartikkelien, pintajännityksestä johtuen, keräys on tehokkaampaa saatettaessa magneetti liuokseen. Ongelmaksi tässäkin tapauksessa muodostuu pienten liuostilavuuksien käsittely ja myös riittävän tehokkaan magneetikentän synnyttäminen. Ulkopuolinen magneetti voi olla kuinka suuri tahansa ja samalla hyvin voimakas kerätäkseen suhteellisen pienetkin magnetoitavat partikkelit reaktioastian sisäseinämään. Magneetin koolle on suuret rajoitukset toimittaessa pienissä astioissa ja pienissä liuostilavuuksissa. Magneetikentän voimakkuus on verrannollinen magneetin kokoon ja kerättävän magnetoitavan materiaalin etäisyyteen. Suuria magneettipartikkeleita (10-100 μm) voidaan kerätä suhteellisen heikoillakin magneeteilla kun taas erittäin pieniä ($< 0.05 \mu\text{m}$) magneettipartikkeleita voidaan kerätä vain erityisten high-gradient magneettien avulla. Käytännön sovelluksissa esimerkiksi molekyylibiologian alueella toimitaan 0.1-10 μm läpimittaisten magneettipartikkelien kanssa. Yleensä on edullista käyttää mahdollisimman pieniä magneettipartikkeleita, koska muun muassa niiden sitomiska-

pasiteetti ja reaktiokineettiset ominaisuudet ovat suuret verrattuna suurempiin magneettipartikkeleihin. Pienikokoisen magneetin avulla kyetäänkin yleensä keräämään suhteellisen suuria magneettipartikkeleita, koska magneettikentän ja etäisyyden välillä on voimakas riippuvuus eli magneettikenttä heikkenee nopeasti etäisyyden kasvaessa.

Konkreettisina esimerkkeinä keksinnön sovelluksista molekyylibiologian alalla voidaan mainita:

1. DNA inserttien kloonaukset:

Restriction enzymes (esim. EcoR I, Hind III, Bam HI, Pst I, Sal I, Bgl II, Kpn I, Xba I, Sac I, Xho I, Hae III, Pvu II, Not I, Sst I, Bgl I)

Creating blunt ends (esim. lämpöstabiilit polymeraasit, Klenow Fragment DNA Polymerase I, Mung Bean nukleasi)

Ligation (esim. T4 DNA Ligase, E. coli DNA Ligase, T4 RNA Ligase)

Phosphorylation (esim. T4 Polynucleotide Kinase)

Dephosphorylation (esim. CIAP, E. coli Alkaline Phosphatase, T4 Polynucleotide Kinase)

Nested deletions (esim. T4 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraasit, Exo III Nuclease, Mung Bean Nuclease)

2. cDNA:n syntetisointi ja kloonaukset: (esim. Reverse Transcriptase, RNase H, DNA polymerase I, T4 DNA polymerase I, E. coli DNA Ligase)

3. Nukleiinihappojen leimaus:

5' leimaus (esim. T4 Polynucleotide Kinase)

3' addition (esim. T4 RNA Ligase)

3' fill-in (esim. Klenow Fragment DNA Polymerase I, T4 DNA Polymerase)

3' exchange (esim. T4 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraasit)

Nick-translation (esim. E. coli DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraasit)

Replacement synthesis (esim. T4 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraasit, Exo III Nuclease)

Random priming (esim. Klenow Fragment DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraasit)

RNA probes (esim. T7 RNA Polymerase, SP6 RNA Polymerase)

4. Nukleiinihappojen sekventointi:

DNA:n sekventointi (esim. E. coli DNA Polymerase I, Klenow Fragment DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraasit)

RNA:n sekventointi (esim. Reverse Transcriptase, lämpöstabiilit käänteistanskriptaasit)

5. Nukleiinihappojen mutagenointi:

Oligonucleotide directed (esim. T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraasit)

Misincorporation (esim. Exo III Nuclease, Klenow Fragment DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraasit)

6. Mapping:

Restriction (esim. Exo III Nuclease)

Footprinting (esim. Exo III Nuclease)

Transcript (esim. Reverse Transcriptase, Mung Bean Nuclease)

7. Nukleiinihappojen (esim. DNA, RNA, mRNA, DNA/RNA koettimet) puhdistaminen ja eristäminen

8. Analyyttiset menetelmät (esimerkkejä):**DNA Diagnostic Techniques:**

- DNA Mapping
- DNA sequencing
- Molecular analysis of point mutations
- Chromosome analysis
- DNA libraries
- DNA amplification methods (PCR, Inverse PCR, Ligase chain reaction (LCR),
Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), Q beta replicase)
- Quantification of DNA/RNA
- Ribonuclease Protection Assay

DNA diagnostics in Genetic disorders

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- AFLP (Amplified Fragment Polymorphism)

DNA diagnostics in Infections:

- bacterial infections
- drug resistance of microorganisms
- epidemiology of infectious diseases

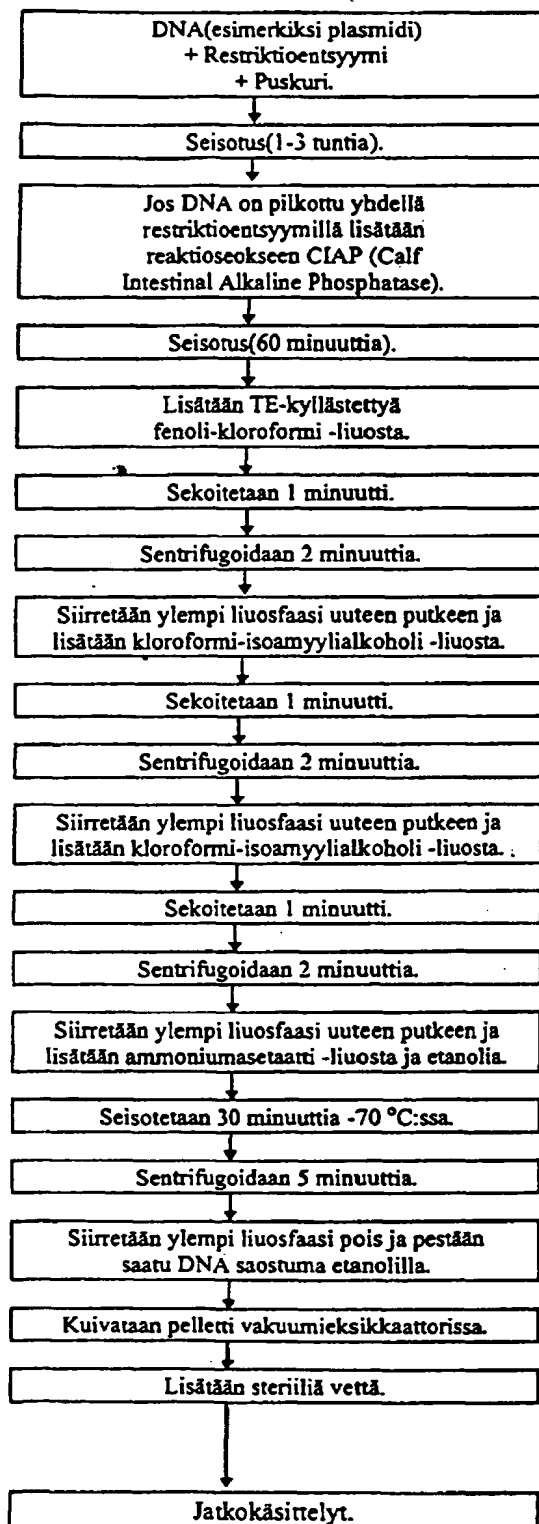
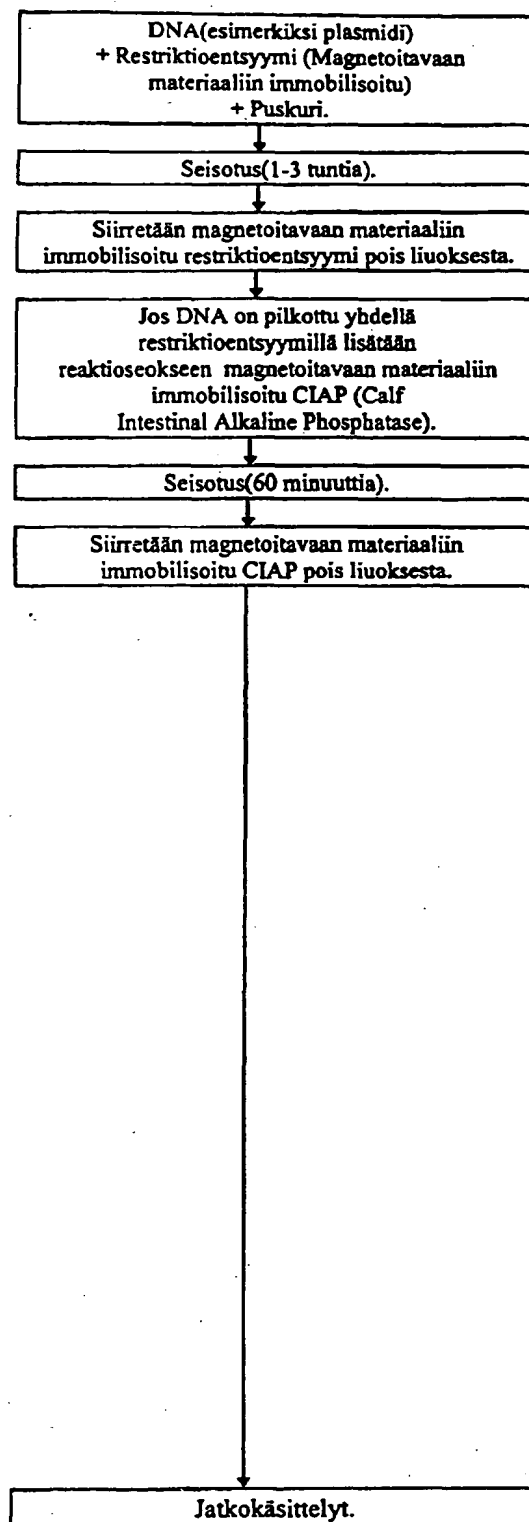
Other applications of DNA diagnostics:

- forensic applications (DNA fingerprints)
- artificial chromosomes
- drug safety studies in molecular level

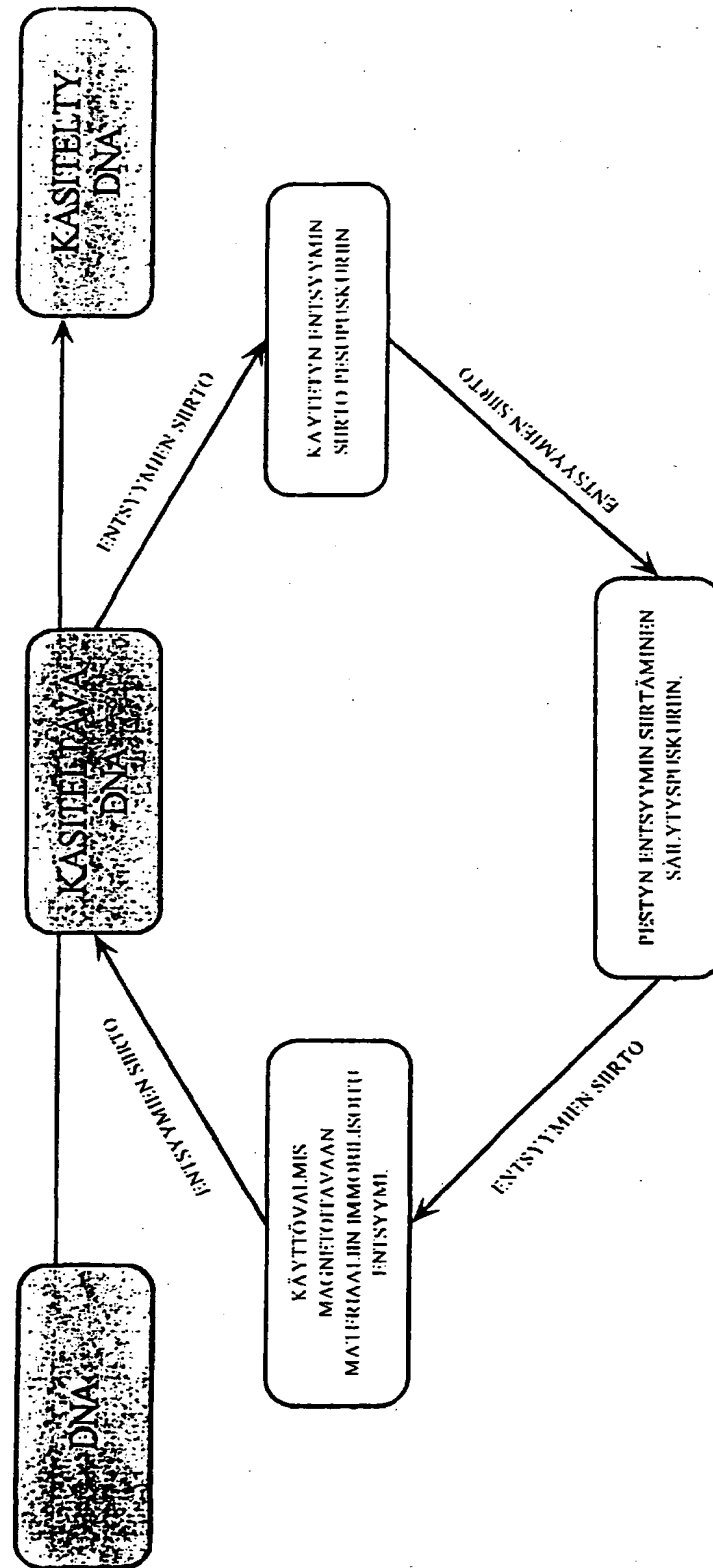
Human Genome Project:

- mapping of chromosomes
- DNA sequencing
- mapping and sequencing of model organisms

Yllä mainitut keksinnön suoritusmuodot ovat vain esimerkkejä keksinnön mukaisen idean toteuttamisesta. Alan ammattimiehelle on selvää, että keksinnön erilaiset suoritusmuodot voivat vaihdella jäljempänä esitettävien patenttivaatimusten puitteissa.

PERINTEINEN MENETELMÄ**UUSI MENETELMÄ**

KAAVIO 2



PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä mikropartikkeleihin immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi ensimmäisestä astiasta toiseen astiaan, jolloin
- 5 - mikropartikkelit ovat magneettista tai magnetisoitavissa olevaa materiaalia, tai mikropartikkelit on liitetty magneettiseen tai magnetisoitavissa olevaan kappaleeseen, ja - mikropartikkelit, joihin entsyymi tai nukleotidisekvenssi on immobilisoitu, vangitaan ensimmäiseen astiaan upotetun
- 10 magneetin avulla, siirretään magneetti vangittuine mikropartikkeleineen toiseen astiaan, ja vapautetaan mikropartikkelit magneetin vaikutuksesta, tunnettu siitä, että magneetin pinta erotetaan mikropartikkeleista ohuen venyvän kalvon avulla.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneetti on kestopagneetti, joka lähennetään kalvoa kohti mikropartikkeleiden vangitsemiseksi kalvoon, ja että kestopagneetti viedään kalvosta poispäin mikropartikkeleiden vapauttamiseksi.
- 20 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneetti on sähkömagneetti, joka magnetisoidaan mikropartikkeleiden vangitsemiseksi kalvoon, ja että sähkömagneetin magneettikenttä poistetaan mikropartikkeleiden vapauttamiseksi.
- 25 4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikropartikkelit ovat superparamagneettisia partikkeleita.
5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikropartikkelit ovat paramagneettisia
- 30 partikkeleita.
6. Jonkin patenttivastimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä,

tunnettu siitä, että entsyymi on restriktioentsyymi.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että entsyymi on DNA/RNA:ta modifioiva entsyymi.

- 5 8. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmän avulla otetaan entsyymi talteen reaktioseoksesta.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmän avulla siirretään entsyymi
10 annosteluastiasta reaktioseokseen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneetin avulla vangitut mikropartikkelit viedään pesunesteeseen ennen kuin ne viedään reaktioseokseen.

- 15 11. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneettisiin tai magnetoitavissa oleviin mikropartikkeleihin immobilisoitu entsyymi tai nukleotidisekvenssi siirretään automaattiseen laitteeseen liitetyn siirtovälineen avulla.

- 20 12. Mikropartikkeleihin immobilisoidun molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin annostelu- ja pesujärjestelmä, tun-
nettu siitä, että järjestelmä käsittää
- levyn (30), jossa on reagenssikuoppia (31), jotka sisältävät valmiiksi annosteltavan määrän mikropartikkeleita,
25 joihin entsyymi on sidottu, ja mahdollisesti tarvittavat säilytysaineet, ja pesunestekuoppia (32), jotka sisältävät sopivan pesunesteen, johon reagenssikuopasta nostettu mikropartikkelimäärä on upotettavissa pesua varten ennen reaktioastiaan vientiä, sekä
30 - siirtovälineen (10), joka käsittää tangon (17), ja sen päässä olevan magneetin (18), sekä ohuen venyvän kalvon (21), joka erottaa magneetin (18) mikropartikkeleista,

mutta joka ei olennaisesti heikennä mikropartikkeleihin kohdistuvaa magneettikenttää.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen annostelu- ja pesujärjestelmä, tunnettu siitä, että se käsittää pesunestekuoppia
5 (33), jotka sisältävät sopivan pesunesteen reaktioastiasta reaktion jälkeen siirrettävien mikropartikkelien pesua varten ennen mikropartikkelien vientiä jatkosäilytysastiaan (34).

14. Patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukainen annostelu- ja
10 pesujärjestelmä, tunnettu siitä, että reagenssikuopat (31) ja pesunestekuopat (32, 33) on järjestetty vierekkäisiin riveihin ja että mahdollinen jatkosäilytysastia (34) on yksittäisenä kuoppa levyllä.

15. Immobilisoitua molekyylibiologiassa käytettävää entsyymiä tai nukleotidisekvenssiä sitovien mikropartikkeleiden vangitsemiseen ja uudelleen vapauttamiseen soveltuva siirtoväline (10), tunnettu siitä, että se käsittää tangon (17), ja sen päässä olevan magneetin (18), sekä ohuen venyvän kalvon (21), joka erottaa magneetin (18) mikropartikkeleista, mutta joka ei olennaisesti heikennä mikropartikkeleihin kohdistuvaa magneettikenttää.
20

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen siirtoväline, tunnettu siitä, että se käsittää putkimaisessa runko-osassa (11) aksiaalisuunnassa edestakaisin liikuteltavissa olevan
25 tangon (17), jonka kärjessä oleva magneetti (18) on kesto-
magneetti, ja runko-osan (11) päässä olevan karkikuvun (20), jonka kalvomaista pohjaa (21) vasten kestmagneetin pinta (22) on painettavissa, mikropartikkeleiden vangitsemiseksi kalvomaiseen pohjaan (21), josta mikropartikkelit
30 on irrotettavissa kun kestmagneettia (18) liikutetaan pois-
pään kalvomaisesta pohjasta (21).

17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen siirtoväline, tunnettu siitä, että magneetti (18) on sähkömagneetti, jonka tangon

(17) kärjessä on ohut venyvä kalvo (21), ja että sähkömagneetti on magnetisoitavissa mikropartikkeleiden vangitsemiseksi kärkiosan kalvoon (21), josta mikropartikkelit on irrotettavissa, kun sähkömagneetin magneettikenttä poistetaan.

18. Menetelmä DNA:n pilkkomiseksi restriktioentsyymien avulla, tunnettu siitä, että mikropartikkeleihin immobilisoitu restriktioentsyymi siirretään reaktioastiaan, jossa DNA:n pilkkominen suoritetaan, ja että immobilisoitu restriktioentsyymi siirretään pois reaktioastiasta halutun reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikropartikkeleihin immobilisoitu modifioiva entsyymi, erityisesti proteinaasi K, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), E. coli alkaline phosphatase, DNA ligaasi, RNA ligaasi, DNA polymeraasi, RNA polymeraasi tai nukleaaasi siirretään reaktioastiaan, ja että immobilisoitu entsyymi siirretään pois reaktioastiasta halutun reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

20. Menetelmä nukleotidisekvenssin, kuten DNA:n, RNA:n, mRNA:n tai cDNA:n, siirtämiseksi astiasta toiseen, tunnettu siitä, että mikropartikkelit, joihin nukleotidisekvenssi tulee sitoutumaan, siirretään reaktioastiaan, jossa nukleotidisekvenssi (DNA, RNA, mRNA tai cDNA) saatetaan sitoutumaan mikropartikkeleihin, ja mikropartikkelit siirretään pois reaktioastiasta halutun käsittelyajan jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

21. Menetelmä entsyymien inaktivoimiseksi Proteinaasi K:n avulla, tunnettu siitä, että mikropartikkeleihin immobilisoitu Proteinaasi K siirretään reaktioastiaan, jossa entsyymien inaktivoiminen suoritetaan, ja että immobilisoitu Proteinaasi K siirretään pois reaktioastiasta halutun reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

mällä.

22. Menetelmä molkyylibiologiassa käytettävien, mikropar-
tikkeleihin immobilisoitujen restriktioentsyymien tai
DNA/RNA:ta modifioivien entsyymien käyttämiseksi analyyytti-
5 siin menetelmiin, tunnettu siitä, että immobilisoidut
entsyymit siirretään reaktioastiaan, jossa halutun reaktion
annetaan tapahtua, ja immobilisoidut entsyymit siirretään
pois reaktioastiasta reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1
mukaisella menetelmällä.

0
0
0
0
0
0
0

PATENTKRAV

1. En metod för att förflytta ett vid mikropartiklar immobiliserat enzym, speciellt ett enzym som skall användas i molekylbiologin, eller en vid mikropartiklar
- 5 immobiliserad nukleotidsekvens, från ett kärl till ett annat kärl, varvid
 - mikropartiklarna består av ett material, som är magnetiskt eller som kan magnetiseras, eller mikropartiklarna har fästats vid ett stycke som är magnetiskt eller som kan magnetiseras, och
 - mikropartiklarna, vid vilka enzymet eller nukleotidsekvensen immobiliserats,
 - 10 infångas med hjälp av en i det första kärlet nedsänkt magnet, magneten med de infångade mikropartiklarna förflyttas till det andra kärlet, och mikropartiklarna befrias från magnetfältets verkan kännetecknad av att magnetens yta åtskiljs från mikropartiklarna med hjälp av en tunn tänjbar membran.
- 15 2. En metod enligt patentkravet 1, kännetecknad av att magneten är en permanentmagnet, som förflyttas mot membranen för att infånga mikropartiklarna vid membranen, och att permanentmagnetens förflyttas bort från membranen för att befria mikropartiklarna.
- 20 3. En metod enligt patentkravet 1, kännetecknad av att magneten är en elmagnet, som magnetiseras för att infånga mikropartiklarna vid membranen, och att elmagnetens magnetfält avlägsnas för att befria mikropartiklarna.
- 25 4. En metod enligt patentkravet 1, 2 eller 3, kännetecknad av att mikropartiklarna är superparamagnetiska partiklar.
5. En metod enligt patentkravet 1, 2, eller 3, kännetecknad av att mikropartiklarna är paramagnetiska partiklar.

6. En metod enligt något av patentkraven 1 - 5, kännetecknad av att enzymet är ett restriktionsenzym.
7. En metod enligt något av patentkraven 1 - 5, kännetecknad av att enzymet är ett enzym som modifierar DNA eller RNA.
8. En metod enligt något av de tidigare patentkraven, kännetecknad av att man med hjälp av metoden återvinner enzymet från en reaktionsblandning.
9. En metod enligt något av patentkraven 1 - 7, kännetecknad av att man med hjälp av metoden förflyttar enzymet från doseringskärlet till reaktionsblandningen.
10. En metod enligt patentkravet 9, kännetecknad av att mikropartiklarna, vilka man infångat med hjälp av magneten, förflyttas i en tvättvätska innan de förflyttas i reaktionsblandningen.
11. En metod enligt något av patentkraven 1 - 10, kännetecknad av att enzymet eller nukleotidsekvensen som immobiliserats vid mikropartiklar, som är magnetiska eller kan magnetiseras, förflyttas med ett överföringsmedel anslutet till en automatisk anordning.
12. En anordning för dosering och tvättning av vid mikropartiklar immobiliserade enzymer som används i molekylbiologin, kännetecknad av att anordningen omfattar - en skiva (30) med reagensgropar (31), vilka innehåller en färdigt doserad mängd mikropartiklar, vid vilka enzymet är bundet, och eventuellt erforderliga konserveringsmedel, och tvättvätskegropar (32), som innehåller en lämplig tvättvätska, i vilken den från reagensgropen avlägsnade mikropartikelmängden kan doppas för tvätt innan den överförs till reaktionskärlet, och - ett överföringsmedel (10), som omfattar en stång (17), och en i ändan på denna befintlig magnet (18), samt en tunn tänjbar membran (21), som skiljer magneten

(18) från mikropartiklarna, men som inte väsentligt försvagar magnetfältet som mikropartiklarna utsätts för.

13. En anordning för dosering och tvättning enligt patentkravet 12, kännetecknad av att den omfattar tvättvätskegropar (33), som innehåller en lämplig tvättvätska för tvättning av mikropartiklarna, som skall överföras från reaktionskärlet efter reaktionen, innan de förflyttas till ett förvaringskärl (34) för fortsatt bruk.

14. En anordning för dosering och tvättning enligt patentkravet 12 eller 13, kännetecknad av att reagensgroparna (31) och tvättvätskegroparna (32, 33) är ordnade i brevid varandra liggande rader och att ett eventuellt förvaringskärl (34) för fortsatt bruk utgör en enskild grop på skivan.

15. Ett överföringsmedel (10) för att infånga och befria mikropartiklar vid vilka ett enzym eller en nukleotidsekvens, som används vid molekylbiologin, immobiliserats kännetecknat av att det innefattar en stång (17), och en i ändan på denna befintlig magnet (18), och en tunn tänjbar membran (21), som skiljer magneten (18) från mikropartiklarna, men som inte väsentligt försvagar magnetfältet som mikropartiklarna utsätts för.

20

16. Ett överföringsmedel enligt patentkravet 15, kännetecknat av att det omfattar en i en rörformad kropp (11) befintlig stång (17), som kan förflyttas axiellt fram och tillbaka, och att magneten (18) i ändan på denna är en permanentmagnet, och en i ändan på kroppen (11) befintlig spetsbuk (20), mot vars membranlika botten (21) permanentmagnetens yta (22) kan tryckas för att infånga mikropartiklarna vid den membranlika botten (21), från vilken mikropartiklarna kan lösgöras då permanentmagnet (18) förflyttas bort från den membranlika botten (21).

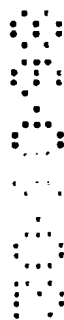
17. Ett överföringsmedel enligt patentkravet 15, kännetecknat av att magneten (18) är en elmagnet, i ändan på vars stång (17) en tunn tänjbar membran (21) är belägen,

30

och att elmagneten kan magnetiseras för att infånga mikropartiklarna vid spetsdelens membran (21), från vilket mikropartiklarna kan lösgöras, då elmagnetens magnetfält avlägsnas.

- 5 18. En metod att klyva DNA med restriktionsenzymer, känneteknad av att restriktionsenzymet immobiliserat vid mikropartiklarna förflyttas till reaktionskärlet, där klyvningen av DNA utförs, och att det immobiliserade restriktionsenzymet förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad reaktion medelst metoden enligt patentkravet 1.
- 10 19. En metod enligt patentkravet 18, kännetecknad av att det modifierande, vid mikropartiklarna immobiliserade enzymet, speciellt proteinas K, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), E. coli alkalisk fosfatas, DNA ligas, RNA ligas, DNA polymeras, RNA polymeras och nukleas, förflyttas bort från reaktionskärlet
- 15 efter önskad reaktion medelst metoden enligt patentkravet 1.
- 20 20. En metod för förflyttning av en nukleotidsekvens, såsom DNA, RNA, mRNA eller cDNA, från ett kärl till ett annat, kännetecknad av att mikropartiklarna, vid vilka nukleotidsekvensen kommer att fästas, överförs till ett reaktionskärl, där
- 20 nukleotidsekvensen (DNA, RNA, mRNA eller cDNA) fästes till mikropartiklarna, och mikropartiklarna förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad behandlingstid medelst metoden enligt patentkravet 1.
- 25 21. En metod för inaktivering av enzymer med hjälp av Proteinase K, kännetecknad av att Proteinase K, som är immobiliserat vid mikropartiklarna, förflyttas till reaktionskärlet, där inaktiveringen av enzymerna utförs, och att immobiliserat Proteinase K förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad reaktion medelst metoden enligt patentkravet 1.

22. En metod för användning av vid mikropartiklar immobiliserade restriktionsenzymer eller DNA/RNA modifierande enzymer, som skall användas inom molekylbiologin, för analytiska metoder, kännetecknad av att de immobiliserade enzymerna förflyttas till reaktionskärlet, där man låter den önskade
- 5 reaktionen ske, och de immobiliserade enzymerna förflyttas bort från reaktionskärlet medelst metoden enligt patentkravet 1.



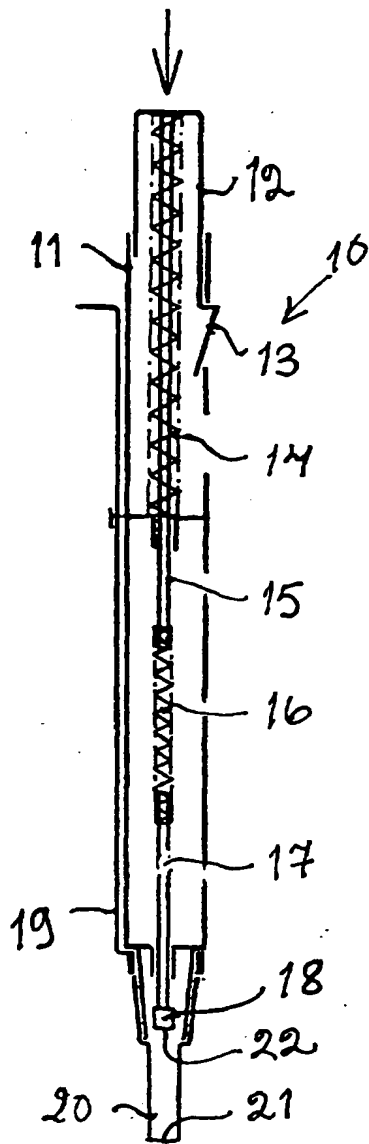


FIG. 1

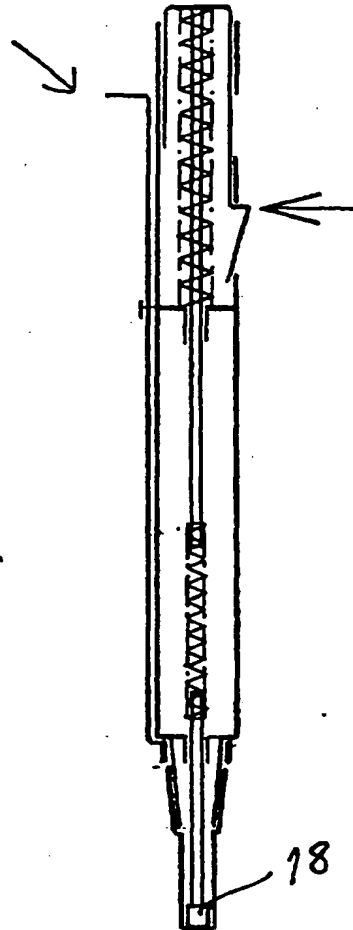


FIG. 2A

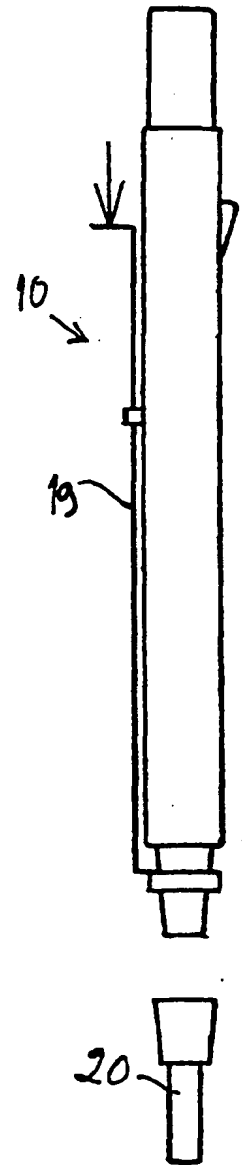


FIG. 3

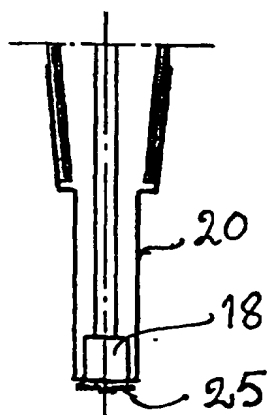


FIG. 2B

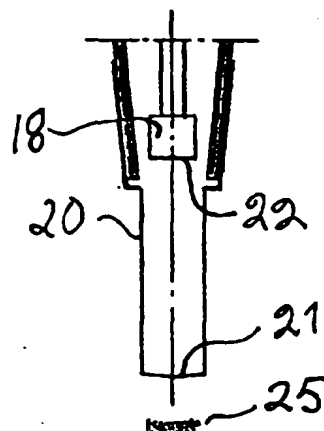


FIG. 2C

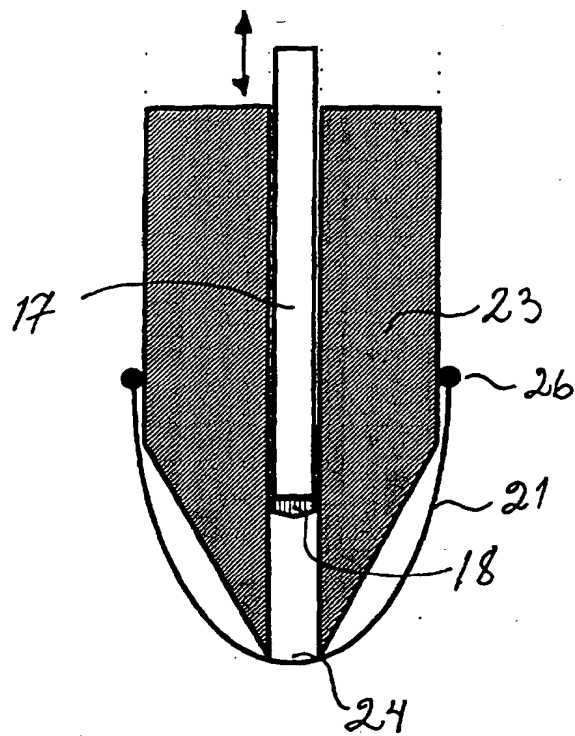


FIG. 4A

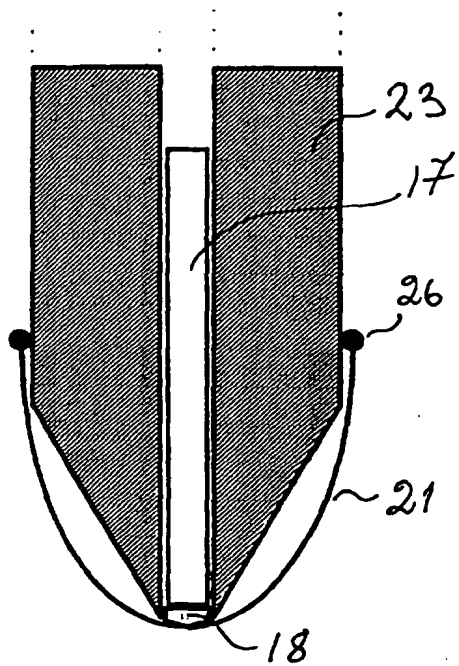


FIG. 4B

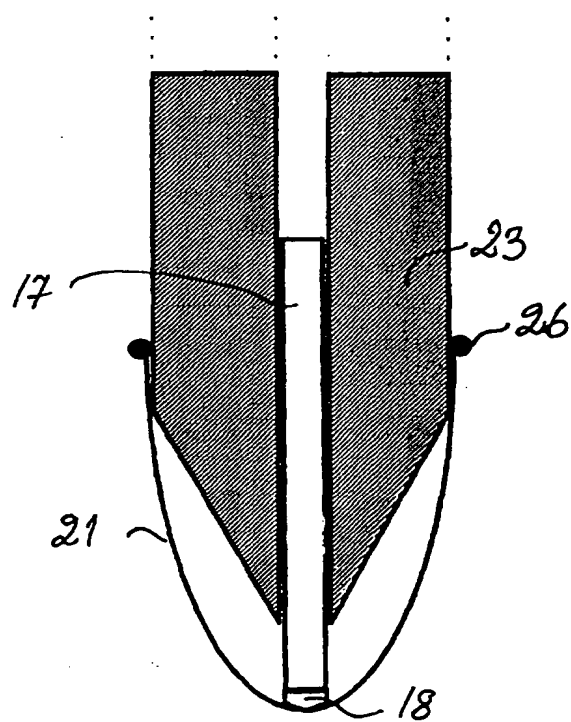


FIG. 4C

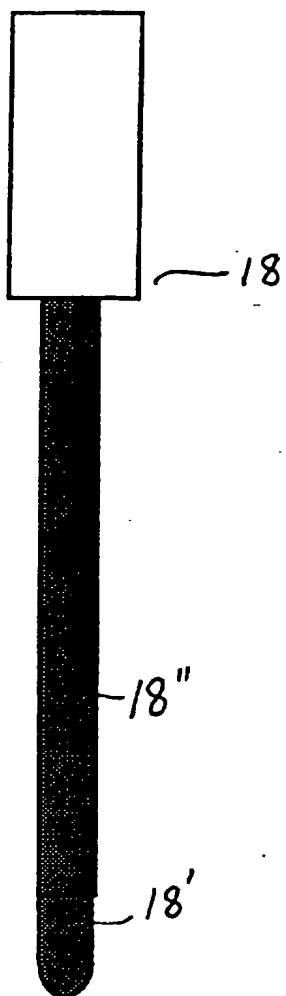


FIG. 5A

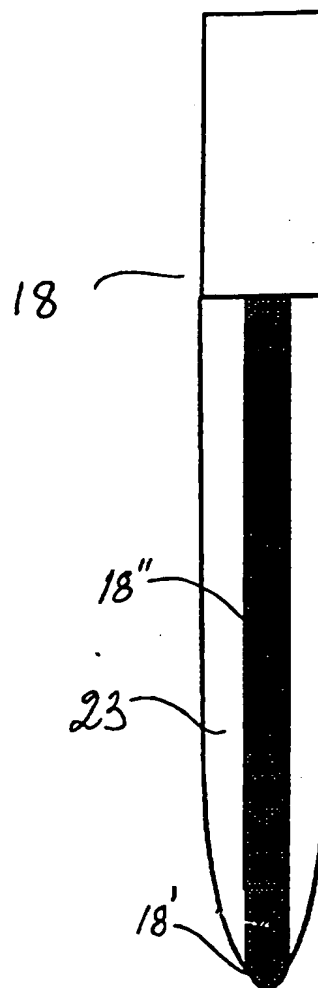


FIG. 5B

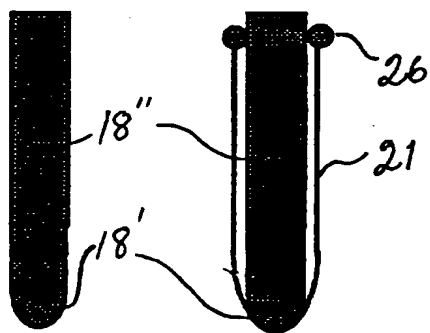


FIG. 5C

FIG. 5D

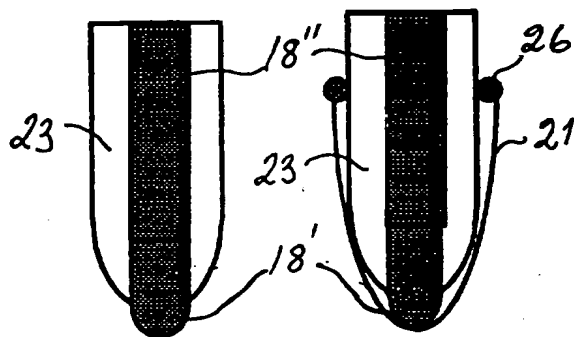


FIG. 5E

FIG. 5F

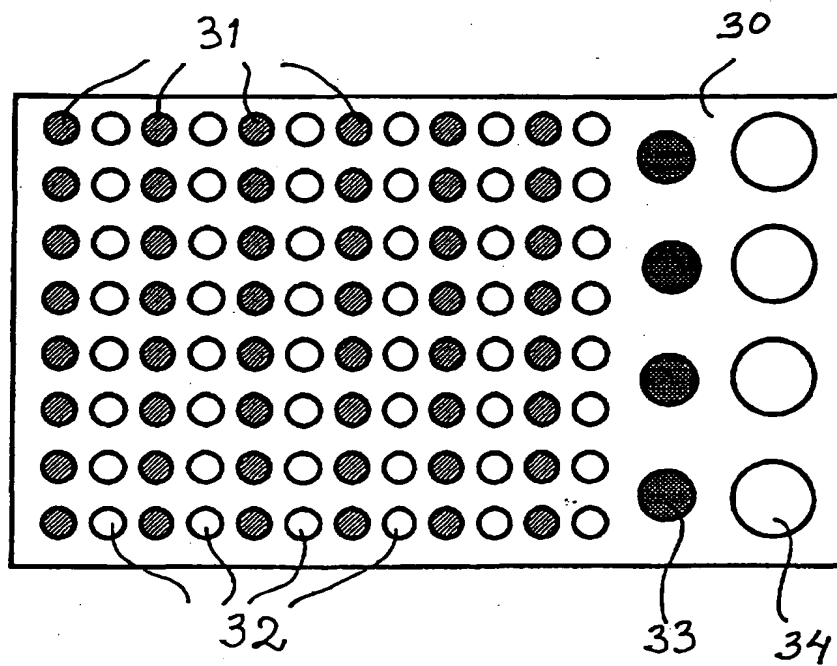


FIG. 6